云南植物研究 8（1）：67—72，1986
Acta Botanica Yunnanica

甘蔗组织培养中2，4-D对过氧化物酶同工酶的影响

罗紫娟　陈立业　梁庄

（广西师范大学生物系）

摘要　在甘蔗组培育苗中，过氧化物酶同工酶活性与胚性细胞团的分化程度有关。其中的Bo酶带与分化状态密切相关，是分化成苗的必要条件之一。细胞分裂素诱导Bo酶带的出现。2，4-D抑制细胞分裂素对Bo酶带的诱导，使Bo酶带消失，并且改变了过氧化物酶同工酶的组成与活性，抑制分化成苗，促进胚性细胞团的旺盛成长。

关键词　过氧化物酶同工酶；分化；2，4-D

甘蔗组培育苗应用于生产已通过技术鉴定。目前甘蔗组培苗已大量推广，并继续进行着优良胚性细胞团的筛选和培育工作。作为这项工作的一部份，我们对激素在甘蔗组培育苗中的作用进行了研究。已知在诱导培养基中加入高浓度的2，4-D（2—3 mg/l）有利于从外植体直接产生胚性细胞团，和筛选出淡黄色、颗粒型、分散性大的胚性细胞团无性系[3]。另外，欲使这些胚性细胞团迅速分化成苗，则要把它们转入分化培养基中去。诱导培养基和分化培养基之间的一个明显区别在于2，4-D的有无。于是我们研究了2，4-D对过氧化物酶同工酶的影响，为筛选优良胚性细胞团提供依据。

已有许多研究报告指出，过氧化物酶能够受激素的控制，同时，它又随着植物体的生长过程而发生变化。程家胜用苹果进行了激素对过氧化物酶同工酶的影响的研究[5]。王熊用烟草观察其组培过程中过氧化物酶同工酶的变化[1]。Galston，A．W．和 S．Lavee，以及 Dendsay，J．P．S．和 R．S．Sachar 等人对过氧化物酶同工酶受激素控制的问题进行了大量的研究[6、7]。因此，我们认为有可能用过氧化物酶同工酶的变化作为指标来探讨2，4-D的作用。

前人的研究集中于 IAA 对过氧化物酶同工酶的影响，对 2，4-D 与过氧化物酶的关系没有作过详细的研究。目前仍未见有甘蔗组培中激素对过氧化物酶的影响的报告。而2，4-D不仅在甘蔗组培中，而且在其他组培中都表现出很重要的作用。因此，我们对2，4-D以及其他激素在甘蔗组培中对过氧化物酶同工酶的影响进行了研究。

本文于1984年11月28日收到。

材料与方法

1.材料

（1）供试材料：赣14号甘蔗品种经组培继代二次的胚性细胞团。

（2）基本培养基：N_6（用MS微量元素）+KH_2PO_4 100 mg/l+蔗糖3％+琼脂0.5％，pH 5.8。

（3）激素处理：设计了五种激素处理：

①基本培养基+IAA 1 mg/l；②基本培养基+BA 1 mg/l；③基本培养基+IAA 1 mg/l+BA 1 mg/l；④基本培养基+IAA 1 mg/l+BA 1 mg/l+2,4-D 3 mg/l；⑤基本培养基+BA 1 mg/l+2,4-D 3 mg/l。

2.方法

将上述甘蔗胚性细胞团接种于附加了激素的五种培养基中，每种培养基接种10管。培养室温度为25°C±2°C。室内自然光附加1盏40W日光灯（距试管0.3米）。

在培养到5天、8天、14天、18天和22天时，对上述五种培养基中各取一管材料进行电泳。电泳基本方法与吴少伯所述相同[2]。改动部份如下：

（1）各号材料取量200 mg，加提取缓冲液0.66 ml（分两次加入）进行研磨。研磨过程在冰浴中进行。然后在高速台式离心机上离心两次（均为5000 r/min），每次10分钟。取第二次离心后的上清液为电泳样品液。一般现提取现用，或在冰箱中保存不超过24小时即进行电泳。

（2）电泳条件：样品液每柱准确加量30微升，电泳槽置于冰箱中，上槽接负极，下槽接正极。初始电流为1 mA/管，20分钟后增大到2 mA/管。当样品液前端到达凝胶管下端1厘米时停止电泳。整个电泳过程约需2小时。

（3）染色方法采用联苯胺-愈创木酚法。染色时间30分钟。过氧化物酶同工酶带呈紫红色。

（4）取出的凝胶柱保存在3％醋酸溶液中。

实验结果

1.过氧化物酶同工酶谱随着胚性细胞团生长分化过程而变化

胚性细胞团的产生及其分化与2,4-D有密切的关系，一是加入高浓度的2,4-D，得到优良的胚性细胞团；二是完全去除2,4-D，使胚性细胞团迅速分化成苗。在这两种情况下，其内部过氧化物酶同工酶有什么变化呢？

（1）我们对培养在常规的分化培养基上的胚性细胞团进行不同培养天数的过氧化物酶同工酶谱分析，得到没有2,4-D影响时胚性细胞团分化成苗的酶谱变化，其结果见图1。

从图1可以看到：（1）过氧化物酶同工酶谱明显地分为两个活性区，我们定为A区和B区。然后再根据从阴极向阳极的迁移顺序依次编号为A_1、A_2、A_3……B_0、B_1、

B_2……，其中，A_1和B_1是染色较深而且很稳定的标志酶带。（2）酶谱随着胚性细胞团的分化过程发生变化。这种变化主要表现在一些染色较浅的酶带，如A_5、A_6和B_0、B_4、B_5。它们随着幼苗的出现而出现，有随着分化程度发展而变化的趋势。在培养到18天时，开始在胚性细胞团上看到有绿苗形成，在22天时已大量出苗。在这两个时期的酶谱上就出现了A_5、A_6和B_0、B_4及B_5带。特别是B_0带，与幼苗形成的多少密切相关，在大量出现幼苗的第22天材料的酶谱中，B_0酶带明显地显示出来，而且在形成幼苗后稳定存在。

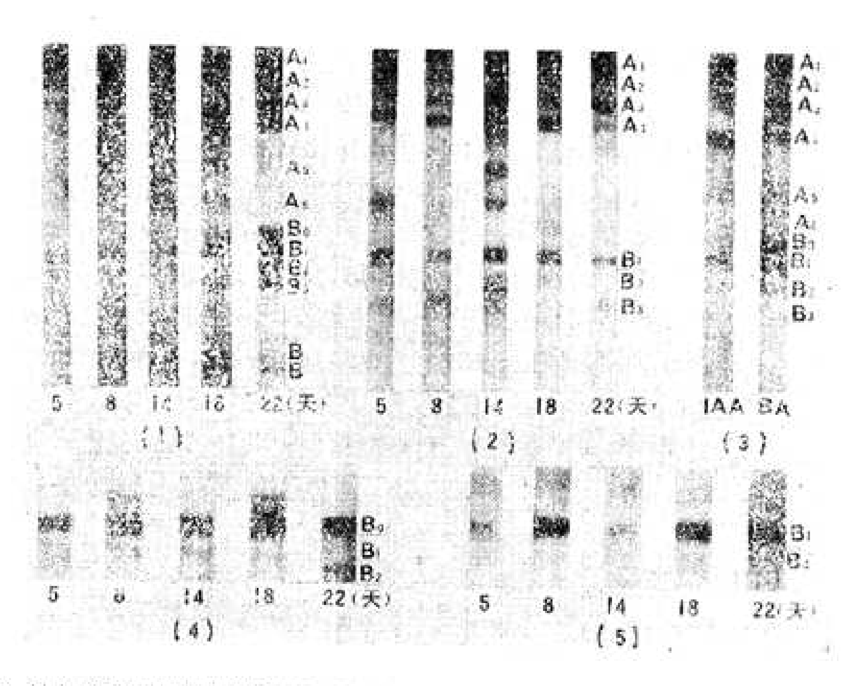


图1.加入 IAA 和 BA时的培养材料不同天数电泳图。图2.在含 IAA 和 BA 的培养基中加入2,4-D后的电泳图变化。图3.只加入 IAA 或 BA 的培养材料在18天时的电泳图。图4.只加入 BA 的培养材料在不同培养天数时的电泳图。图5.在含 BA 的培养基中加入2,4-D时电泳图的变化。

Fig. 1, The electrophoretogram of the cultured material which is cultured on the basal medium adding IAA and BA. Fig. 2, The change of electrophoretogram after adding 2,4-D to the basal medium containing IAA and BA. Fig. 3, Only adding IAA or BA to basal medium, to see the electrophoretogram 18 day-culture-materials. Fig. 4, Only adding BA to basal medium, to see the electrophoretogram of different time-culture-material. Fig. 5, Adding 2,4-D to basal medium containing BA, to see the change of electrophoretogram.

（2）我们在常规分化培养基中加入2,4-D 3 mg/l（即成为继代培养基）对胚性细胞团进行培养，其他培养条件不变。在培养过程中看到胚性细胞团一直旺盛地生长，但没有幼苗出现。取不同培养天数的材料进行电泳分析，得到在2,4-D影响下的胚性细胞团的酶谱变化。其结果见图2。从图2中也可以明显地分两个活性区，A区和B区。与图1比较，在2,4-D影响下的酶谱有些差异，主要表现在一些与分化成苗密切相关的酶带没有出现，如B_0带始终未出现，A_5、A_6和B_4、B_5带的迹象极其微弱。

2. 2,4-D 与其他生长素和细胞分裂素的关系

在分化培养基和诱导（继代）培养基进行比较时看到，两种培养基的主要区别在于

有或没有2,4-D。已如前述，由于2,4-D的加入使 B_0 带消失，细胞团旺盛生长，抑制了分化成苗。那么，B_0 带与激素，B_0 带与分化之间究竟有着什么样的联系呢？为此，我们把各种激素分开来，在一种培养基中只加入生长素（IAA），另外一种培养基中只加入细胞分裂素（BA）。在这两种含单一激素的培养基上都未能使胚性细胞团分化成苗。其中，只加入生长素的培养材料长成愈伤组织，细胞团无色透明，不成颗粒型。只加入细胞分裂素的培养材料保持在胚性细胞团状态，细胞团色泽淡黄，细胞紧凑，呈颗粒型，分散性好。当培养到18天时，取上述两种材料进行电泳，得到酶谱如图3所示。

把图3与图1中培养18天材料的酶谱相对照来看，只加入 IAA 时，有些酶带未出现，如A_3、A_5、B_0、B_4和B_5；只加入BA时，有另一些酶带未出现，如B_4和B_5。而且有些酶带的迁移率和酶带宽度有所变化，如A_5、A_8和B_3。此外，我们注意到，在IAA处理时B_0带消失，而在BA处理时B_0带出现，说明B_0带受细胞分裂素的诱导。

进一步的问题是，在细胞分裂素的单独作用下出现了 B_0 带，但此时胚性细胞团并没有分化成苗。那么，如何解释 B_0带与分化的关系呢？我们注意追踪 B_0带在不同培养时期的变化，从纵的方面来探索这个关系。得到酶谱变化结果如图4所示。我们发现B_0带在培养过程中呈周期性变化，在8天、18天的培养材料中出现 B_0带，而在5天、14天和22天的培养材料中 B_0带消失了。这种周期性恰好与我们在甘蔗组培中观察到的胚性细胞团分裂高峰的周期性相一致，即在培养过程中，胚性细胞的分裂速度呈周期性变化，在8天、18天时出现分裂高峰[3]。从而可知，在细胞分裂素作用下，B_0带随着细胞分裂高峰的出现而出现，当分化条件不满足时，B_0带就再次消失；当分化条件满足时，B_0带就随着胚性细胞团分化成苗而稳定存在。这样，我们认为，B_0带的出现是胚性细胞团分化成苗的必要条件之一，而不是唯一的条件，要使胚性细胞团分化成苗，就一定要有 B_0带诱导出现，但 B_0带的出现并不一定使胚性细胞团分化成苗，还必须同时满足其他酶带条件。

前面已经谈到，2,4-D对B_0带有抑制作用，那么2,4-D与细胞分裂素对B_0带的作用有何关系呢？我们在含有细胞分裂素的培养基中加入2,4-D，采用与图4相同的观察方法，得到结果如图5。我们看到，2,4-D抑制了细胞分裂素对B_0带的诱导，在各个培养时期都没有B_0带出现。此时，培养中的胚性细胞团的生长明显地受到促进。

综合上述各个实验结果，我们还注意到在单独使用生长素或细胞分裂素时，胚性细胞团不能分化成苗，在二类激素配合使用时就能大量分化出苗。与此相对应地，从酶谱上来看，生长素与细胞分裂素配合使用时出现较多的酶带，但又不是两类激素单独使用时的酶谱的简单加合，无论是酶带的宽度，或是酶带染色深度都有些变化。从而可知，在二类激素的共同作用下，过氧化物酶同工酶在组成和活性上都有所变化。与此同时，从外部形态建成来看有大量幼苗形成。

讨　　论

1.从相同培养条件不同培养时期的酶谱分析中，我们看到一个普遍的现象，就是同一种细胞组织在不同的生长状态下和不同的生长时期里，有不同的过氧化物酶同工酶

谱。这说明，过氧化物酶同工酶在组成和活性上是多变的。因此，我们就不能可靠地应用过氧化物酶来进行分类鉴定方面的工作。但是从另一方面来看，正是由于它的多变性，其中一些较活跃的同工酶带就很有可能与细胞组织的生长分化状态有特定的内在联系。在我们的工作中就看到B_0带的出现与细胞团的分化密切相关，它是分化的前提条件之一。因此，我们在以后的工作中就可以通过对B_0带的分析来考察试验中的甘蔗胚性细胞团是否具备了这方面的分化条件，给我们提供了一个生化上的指标。

2. 从不同的激素处理中看到，细胞分裂素BA诱导B_0带出现，2,4-D能够抑制BA对B_0带的诱导，生长素IAA没有对B_0带表现出直接的关系。这使我们得以在酶与激素之间建立起一定的联系，给我们在新的研究中提供了手段。例如，当我们试验其他细胞分裂素类激素或甚至是某种未知物质对甘蔗胚性细胞团生长分化的影响时，如果我们以外部形态上可见的幼苗分化为指标，那么，由于各方面分化条件的相互影响，这种物质的影响作用往往难以灵敏地反映出来。而以过氧化物酶同工酶的反映作为指标的话，当这种物质作用下引起B_0带的出现时，也就是说这种物质和BA有诱导B_0带出现的相同作用，这就表示这种物质的试验有可能成功，尽管此时在胚性细胞团的外部形态上可能仍然是毫无变化的。

3. 从我们的工作中进一步证实了激素——蛋白质（酶）——生长发育这样的作用关系。我们看到在只加入一种激素时，无论是哪一种激素，都没有使胚性细胞团分化成苗，只有当适当的激素配合使用时才出现分化。我们还看到单一激素处理和适当激素配合作用下，过氧化物酶同工酶表现出差异。这就是说，激素、酶、分化三者之间是有内在联系的。这是因为激素控制着基因的顺序表达，控制着植物体的生长发育。而同工酶是基因表达的次级反应。所以，不同的激素作用时就出现不同的同工酶谱和不同的生长分化状态。

参考文献

〔1〕 王熹、罗士韦，1981：植物生理学报，7（1）：73—77。
〔2〕 吴少伯，1979：植物生理学通讯，（6）：28—30。
〔3〕 罗紫娟、梁倩华，1984：植物生理学通讯，（2）：29—32。
〔4〕 曹宗巽、梅慧生、杨中汉、朱广廉、钟海文，1980：植物生理学报，6（2）：149—155。
〔5〕 程家胜，1982：植物生理学通讯，（6）：28—30。
〔6〕 Dendsay, J. P. S. and R. C. Sacher, 1978: *Phytochemistry* 17: 1017—1019.
〔7〕 Galston, A. W. and S. Lavee, 1968: *Amer. J. Bot.* 55: 890—893.

THE EFFECTS OF 2,4-D ON PEROXIDASE ISOENZYME IN TISSUE CULTURE OF SUGAR-CANE

Luo Zijuan, Chen Liye and Liang Zhuang

(Department of Biology, Guangxi Normal University)

Abstract The activity of peroxidase isoenzyme has relation to the differential degree of embryonic cells in the tissue culture of sugar-cane. Among the peroxidase isoenzyme the Bo band has a close relationship with the differential condition. It is one of the essential precondition of differentiaton.

The Bo band's appearance can be inducted by cytokintin, but the induction can be inhibited by 2,4-D. So the Bo band disappear when 2,4-D is remaining. Moreover the 2,4-D changes the peroxidase isoenzyme's composition and its activity, inhibits the differentiation of embryonic cell of sugar-cane and promotes its growth.

Key words Peroxidase isoenzyme; Differentiation; 2,4-D